

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 505**

51 Int. Cl.:

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2008 PCT/IB2008/002051**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2010 WO2010015874**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2008 E 08789007 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2323666**

54 Título: **Usos farmacéuticos de lanosta-8,24-dien-3-oles**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2017

73 Titular/es:
AMAZONIA FITOMEDICAMENTOS LTDA (100.0%)
Rua Dom Silvério 517
CEP-60811-000 Fortaleza, CE, BR

72 Inventor/es:
PIANOWSKI, LUIZ FRANCISCO;
CALIXTO, JOAO BATISTA;
LEAL, PAULO CESAR y
CHAVES, CLAUDIO PAULINO

74 Agente/Representante:
ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 619 505 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

USOS FARMACÉUTICOS DE LANOSTA-8,24-DIEN-3-OLES**DESCRIPCIÓN**

5 Esta invención se refiere en general a lanosta-8,24-dien-3-oles, una familia de terpenoles tetracíclicos, para su uso en el tratamiento del dolor, dolor asociado con inflamación y/o dolor asociado con tumores cancerosos mediante la inhibición de determinadas enzimas cuya actividad está relacionada con la proliferación de determinados tipos de cáncer.

10 En el siguiente texto, el compuesto eufol, un miembro de la familia de lanosta-8,24-dien-3-oles, se mencionará a menudo, y debe entenderse que esto se realiza simplemente para una mayor facilidad de referencia, y por este motivo, no se excluye de la invención otro compuesto de lanosta-8,24-dien-3-ol.

Antecedentes de la invención

15 Cáncer es un nombre dado a un grupo de más de 100 enfermedades que tienen en común el crecimiento desorganizado de células que invaden tejidos y órganos, y que pueden diseminarse a otras regiones del cuerpo, lo que se conoce como metástasis.

20 Diferentes tipos de cánceres corresponden a los diversos tipos de células corporales. Por ejemplo, hay varios tipos de cáncer de piel, ya que la piel está formada por más de un tipo de célula. Si el cáncer se origina en los tejidos epiteliales, tales como piel o una mucosa, se denomina carcinoma. Si se origina en los tejidos conjuntivos, tales como hueso, músculo o cartílago, se denomina sarcoma. Otras características que distinguen un cáncer de otro son la velocidad de multiplicación celular, y su capacidad para invadir otros tejidos y órganos, cerca o lejos de su origen.

25 Las proteína cinasas de tipo C (PKC) comprenden un grupo de proteína cinasas cuya función y regulación son altamente conservadoras. Las cinasas también se denominan fosfotransferasas, y fosforilan residuos de serina y treonina a partir de sus sustratos y regulan diversas actividades celulares, incluyendo expresión génica, mitosis, movimiento celular, metabolismo y muerte celular programada (apoptosis). Las PKC son objeto de fosforilación antes de activarse, teniendo lugar tal procedimiento durante su translocación del citoplasma a la membrana plasmática. Su activación y translocación del citoplasma a la membrana plasmática se producen en respuesta al aumento transitorio de diacilglicerol (DAG), o a agentes exógenos, conocidos como ésteres de forbol, presentes normalmente en plantas.

30 La familia de PKC comprende 12 isoformas, divididas en tres subcategorías: convencionales (PKCc, dependientes de calcio, y activadas por DAG y fosfatidilserina), originales (PKCn, independientes de calcio, pero activadas por DAG y fosfatidilserina) y atípicas (PKCa, independiente de calcio y activadas por fosfatidilserina, pero no por DAG). Dentro de una única célula, las isoformas presentan diferencias en su distribución, antes y después de la translocación a la membrana celular, y la bibliografía sigue que la función de cada isoforma asociada a una determinada célula puede conferirse por diferencias en la ubicación subcelular de las PKC en los compartimentos citoplasmático de membrana y nuclear.

35 En los últimos años varios estudios han mostrado una relación entre la activación desordenada de las PKC y el desarrollo de procesos patológicos, incluyendo artritis reumatoide, esclerosis múltiple, colitis y diferentes tipos de cáncer. La hipótesis sobre la implicación de las PKC en el cáncer ha recibido mucha atención últimamente, basándose especialmente en los hallazgos de que esas enzimas son el sustrato para promotores naturales de tumores, los ésteres de forbol. La activación aumentada o reducida de las serina-treonina proteína cinasas, incluyendo las PKC, o de los factores de transcripción modulados por las mismas, puede dar como resultado el crecimiento desorganizado de células, provocando los procesos oncológicos. En ese sentido, muchos estudios han mostrado que después de la activación de las PKC se produce un aumento de la fosforilación de factores de transcripción, entre ellos el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la proteína activadora 1 (AP-1), que modulan a su vez la expresión de varias proteínas importantes para la progresión de tumores, incluyendo ciclooxigenasa-2 (COX-2). De este modo, con la activación o el bloqueo de tales rutas intracelulares, compuestos naturales pueden interferir en el crecimiento y proliferación de células anómalas.

45 Los ésteres de forbol se derivan de diterpenos tetracíclicos y parece que se limitan a las familias de plantas *Euphorbiaceae* y *Thymelaceae*. Tales compuestos se estudian frecuentemente debido a sus acciones proinflamatorias y de inducción promotora de tumores particulares. Los mecanismos moleculares que regulan la inducción promotora de tumores de los ésteres de forbol son diferentes de los mecanismos que desencadenan la actividad inflamatoria. La inducción promotora de tumores parece que está asociada con su capacidad de reemplazar DAG en la activación de PKC, y también con su capacidad para estimular la síntesis de las proteínas de ARN y ADN, comportándose como agentes mitogénicos y estimulando el crecimiento celular. En cuanto a la actividad proinflamatoria, los ésteres de forbol movilizan fosfolípidos, liberan ácido araquidónico y producen la secreción de prostaglandinas, lo que conduce a una respuesta inflamatoria de los tejidos. La aplicación tópica de ésteres de forbol, particularmente TPA (13-acetato de tetradecanoilforbol), ha contribuido al entendimiento de mecanismos moleculares relacionados con procesos inflamatorios y cáncer.

Se han sometido a prueba algunos inhibidores de PKC para el tratamiento de cáncer en diferentes fases de pruebas preclínicas. Uno de ellos es la enzastaurina (LY317615), que muestra una actividad importante cuando se administra por vía oral, y eficacia en diferentes modelos de cáncer, *in vitro* e *in vivo* (Journal of Investigative Dermatology (2006) 126, 1641-1647; Cancer Res (2005) 65:7462-7469; Mol Cancer Ther. (2006) 5:1783-1789).

El principal problema en el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias con AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) y fármacos esteroideos (corticoides) son los efectos adversos producidos por los mismos y su eficacia que no es total. Los efectos secundarios notificados con mayor frecuencia son: dolor de cabeza, dolor de estómago, vómitos, diarrea, gastropatías tales como úlceras de estómago y duodeno. Los corticoides pueden elevar la tensión arterial, producir astenia y miopatía, úlceras pépticas, petequias, eritema, acné, dolor de cabeza crónico, hirsutismo, supresión del crecimiento en niños (en tratamientos prolongados), amenorrea, cataratas y glaucoma, aumento de apetito y de peso, náuseas. Los AINE, selectivos de COX-2, pueden aumentar también los riesgos de desarrollar acontecimientos cardiovasculares trombóticos graves, trombosis coronaria y accidentes cerebrovasculares.

En cuanto al tratamiento eficaz para el cáncer, la dificultad es establecer la distinción entre células corporales malignas y normales. Comparten el mismo origen y son muy similares, lo que conduce a la falta de reconocimiento por parte del sistema inmunológico enfrentado a una amenaza. Hasta ahora, se ha tratado el cáncer por medio de cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (terapia con anticuerpos monoclonales). La elección del tratamiento depende de la ubicación, el grado del tumor y la fase de la enfermedad, así como del estado general del paciente. La eliminación completa del tumor, sin daño al resto del organismo es el principal objetivo del tratamiento, lo que puede obtenerse a veces mediante cirugía, pero la propensión de la enfermedad a invadir tejidos adyacentes o diseminarse a sitios distantes (metástasis) limita a menudo su eficacia. La eficacia de la quimioterapia está limitada a menudo por la toxicidad para las demás células del organismo, mientras que la radioterapia puede dañar tejido normal. En inmunoterapia, las células cancerosas desarrollan mecanismos para escapar a la respuesta inmunológica, un fenómeno conocido como resistencia al tratamiento.

Koyama K *et al.* (Planta Medica, 1997, 63:3, 224-227) dan a conocer que los ácidos ganodéricos A, B, G y H y el compuesto C6 se aislaron como componentes antinociceptivos del extracto de *Ganoderma Lucidum*. Dichos compuestos difieren de los lanosta-8,24-dien-3-oles en que no tienen un doble enlace en la posición 24 y portan un grupo COOH en la posición 26.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la diferencia entre el grosor de la oreja antes y después de la aplicación de los compuestos sometidos a prueba, a lo largo del tiempo.

La figura 2 muestra la absorbancia para las tres composiciones sometidas a prueba. Recuadro en blanco: 2,5 µg/oreja de un control positivo, concretamente TPA (13-acetato de tetradecanoilforbol) en un vehículo que comprende una mezcla 3:1 de acetona:etanol; recuadro en negro: un control negativo, concretamente el vehículo, que es una mezcla 3:1 de acetona:etanol; y recuadro en gris: una mezcla de 100 µg de eufol y 2,5 µg de TPA, por oreja, en un vehículo que comprende una mezcla 3:1 de acetona:etanol.

Las figuras 3A y 3B, siendo 3A una gráfica del tiempo frente a la frecuencia de respuesta, y 3B la expresión del área bajo la curva de 3A para cada compuesto sometido a prueba, lo que permite una comparación en porcentaje entre sí.

Las figuras 4A, 4B y 4C, siendo 4A una gráfica del tiempo frente a la frecuencia de respuesta, y 4B y 4C la expresión del área bajo las curvas de 4A para cada compuesto sometido a prueba, lo que permite una comparación en porcentaje entre sí.

Las figuras 5A, 5B y 5C, siendo 5A una gráfica del tiempo frente a la frecuencia de respuesta, y 5B y 5C la expresión del área bajo las curvas de 4A para cada compuesto sometido a prueba, lo que permite una comparación en porcentaje entre sí.

Descripción detallada de la invención

En vista de la técnica anterior, la presente invención da a conocer el uso de lanosta-8,24-dien-3-oles para la inhibición de enzimas cuya actividad está relacionada con la proliferación de células cancerosas, particularmente PKC. Por tanto, la invención se refiere a lanosta-8,24-dien-3-oles para su uso en el tratamiento eficaz del dolor, dolor asociado con inflamación y/o dolor asociado con tumores cancerosos, significativamente sin las desventajas conocidas hasta ahora.

Lanosta-8,24-dien-3-oles adecuados son eufol, tirucalol y lanosterol, sus isómeros, acetatos, solvatos o hidratos.

Pueden obtenerse lanosta-8,24-dien-3-oles, por ejemplo, a partir de plantas de la familia *Euphorbiaceae*, o mediante

síntesis química, siendo la ruta irrelevante para la invención.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere al uso de lanosta-8,24-dien-3-oles para la producción de composiciones farmacéuticas que inhiben la activación aumentada o reducida de serina-treonina proteína cinasas, o de los factores de transcripción modulados por las mismas. Los compuestos químicos de la invención inhiben la activación de tales cinasas, particularmente PKC (proteína cinasas C), cuya actividad se conoce que está relacionada con células cancerosas. También particularmente, los factores de transcripción modulados por dichas cinasas comprenden el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y/o la proteína activadora 1 (AP-1).

Los lanosta-8,24-dien-3-oles de la invención, así como las composiciones que los comprenden, pueden administrarse al sujeto que necesita tratamiento por cualquier vía adecuada, intestinal o parenteral, incluyendo oral, tópica, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, mediante infiltración, mediante inhalación, transdérmica, transmucosa, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, intraocular y sublingual. Vías de administración particularmente adecuadas en la presente invención son de manera tópica y sistémica (infiltración, oral, inhalación mediante pulverización, transdérmica). Los lanosta-8,24-dien-3-oles de la invención pueden estar comprendidos en composiciones de liberación retardada o controlada. Pueden utilizarse en tales composiciones excipientes y adyuvantes conocidos: puede encontrarse una referencia para formas de administración farmacéutica útiles para las composiciones relacionadas con la invención en la publicación Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing, 1965-1990.

Sin excluir cualquier otro compuesto de la familia, lanosta-8,24-dien-3-oles apropiados son uno o más de eufol (RN 514-47-6), tirucalol (RN 514-46-5) y lanosterol (RN 79-63-0), más particularmente eufol.

También se da a conocer el uso de lanosta-8,24-dien-3-oles, o composiciones con los mismos, para la producción de composiciones farmacéuticas para el tratamiento del dolor, dolor asociado con inflamación y/o dolor asociado con tumores cancerosos (respuestas nociceptivas).

Las composiciones de la invención pueden administrarse a pacientes como productos sólidos, líquidos o semilíquidos, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvo, gránulos, suspensiones, emulsiones, dispersiones y cualquier otra forma farmacéuticamente aceptable conocida. Las composiciones podrían contener principios activos adicionales, por ejemplo antibióticos, dependiendo del efecto deseado. Para administración oral como comprimidos o cápsulas (tanto cápsulas blandas como duras), pueden combinarse los lanosta-8,24-dien-3-oles con vehículos inertes farmacéuticamente aceptables, tales como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio, fosfato de calcio, manitol, sorbitol, y similares; para administración oral en forma líquida, pueden combinarse los lanosta-8,24-dien-3-oles con etanol, glicerol, agua, y similares. Cuando se desee o sea necesario, pueden añadirse a la mezcla agentes aglomerantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, color y fragancia. Agentes aglomerantes comunes son glucosa, [beta]-lactosa, edulcorantes derivados del maíz, gomas naturales o sintéticas tales como goma arábica, goma tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, cera y similares. Los lubricantes incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio. Los disgregantes incluyen almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Las composiciones de la invención también pueden administrarse como liposomas o acoplarse con polímeros solubles como vehículos.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden comprender colorantes y edulcorantes para aumentar la aceptación por parte de los pacientes. Vehículos aceptables para formas de dosificación acuosas son, agua, un aceite apropiado, una solución salina, dextrosa acuosa, otras disoluciones de azúcar y glicoles como propilenglicol o polietilenglicoles, tampón fosfato.

Ejemplos

Sin embargo, los siguientes ejemplos son realizaciones concretas de la invención.

En todos los ejemplos siguientes, se mantuvieron ratones macho de 20-30 g en jaulas ventiladas con aire filtrado, con control de humedad (50-60%) y temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$), ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad, con acceso libre a agua y alimentos. Los animales permanecieron en el laboratorio durante un periodo de adaptación de al menos 1 hora antes de las pruebas farmacológicas, realizadas entre las 8:00 y las 17:00 h.

En todos los ejemplos siguientes, se realizaron análisis estadísticos con el software Graph Pad Prism® 5.0.

EJEMPLO 1

Se efectuó una caracterización del efecto irritante de determinados compuestos químicos, comparando los resultados de tratar las orejas de los ratones de manera tópica con:

- 2,5 µg/oreja de un control positivo, concretamente TPA (13-acetato de tetradecanoilforbol) en un vehículo que comprende una mezcla 3:1 de acetona:etanol.
- un control negativo, concretamente el vehículo, que es una mezcla 3:1 de acetona:etanol;
- 100 µg/oreja de eufol, un compuesto de la invención, en un vehículo que comprende una mezcla 3:1 de acetona:etanol;
- una mezcla de 100 µg de eufol y 2,5 µg de TPA, por oreja, en un vehículo que comprende una mezcla 3:1 de acetona:etanol.

Se les aplicó a grupos de 5 miembros de ratones de manera tópica, en la superficie interna de las orejas, las composiciones anteriores. Se midió el grosor de las orejas, antes y después de la exposición a las composiciones sometidas a prueba, usando un micrómetro digital, y las respuestas se expresaron como µm. La figura 1 muestra la diferencia entre el grosor de la oreja antes y después de la aplicación de los compuestos sometidos a prueba, a lo largo del tiempo.

Se muestran los resultados en la figura 1.

Tal como puede observarse, el efecto inhibitor obtenido con eufol fue significativo incluso hasta 24 horas después del tratamiento, indicando el importante efecto farmacocinético sobre la inflamación.

EJEMPLO 2

Este fue una evaluación del efecto de los compuestos de la invención sobre la actividad PKC, en la piel de los ratones. Los animales recibieron las siguientes composiciones de 100 µg/oreja:

- 2,5 µg/oreja de un control positivo, concretamente TPA (13-acetato de tetradecanoilforbol) en un vehículo que comprende una mezcla 3:1 de acetona:etanol.
- un control negativo, concretamente el vehículo, que es una mezcla 3:1 de acetona:etanol;
- una mezcla de 100 µg de eufol y 2,5 µg de TPA, por oreja, en un vehículo que comprende una mezcla 3:1 de acetona:etanol.

Se les aplicó a grupos de 5 miembros de ratones de manera tópica, en la superficie interna de las orejas, las composiciones anteriores. Se midió la actividad PKC, antes y después de la exposición a las composiciones sometidas a prueba, usando ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). La figura 2 muestra la absorbancia para las tres composiciones sometidas a prueba, mencionadas anteriormente.

Tal como puede observarse, el TPA promueve un aumento significativo de la actividad PKC con respecto al grupo tratado con el vehículo, mientras que el tratamiento con eufol reduce significativamente el aumento de la actividad PKC inducido por TPA.

Ejemplos 3, 4 y 5 - Nocicepción

Se evaluó el umbral mecánico nociceptivo de los animales como la frecuencia de respuesta de retirada de pata después de diez aplicaciones de un filamento de Von Frey (VHF, Stoelting, Chicago, EE.UU). Se colocaron los animales individualmente en compartimentos de material acrílico transparente de 9 x 7 x 11 cm sobre una plataforma de malla metálica elevada, para permitir el acceso a las superficies plantares de las patas. Se aplicó el filamento de Von Frey a la pata trasera derecha, observando los criterios de (1) aplicación perpendicular a la superficie plantar con suficiente presión como para doblar el filamento, de modo que se garantice la presión total; (2) se evaluaron los animales cuando se acomodaron las cuatro patas en la malla metálica; (3) se consideró una respuesta de retirada de pata cuando el animal retiró por completo la pata de la malla metálica; (4) se estimuló cada animal 10 veces consecutivas, con 1 segundo de duración cada estimulación; (5) se consideró cada retirada de pata como el 10% de una respuesta, correspondiendo 10 retiradas al 100% de respuesta.

EJEMPLO 3 – Nocicepción inflamatoria inducida por carragenanos

Para la inducción de dolor inflamatorio, cada animal recibió una inyección intraplantar de 20 µl (300 µg/pata) de carragenanos en la pata trasera derecha. Como control, se usaron animales tratados con una disolución de PBS (solución salina tamponada con fosfato) al 0,9% (20 µl/pata). La dosificación de carragenanos produce edema, nocicepción y aumento de tamaño significativo en la pata en la que se realizó la inyección.

Se trataron los animales por vía oral con eufol (30 µg/kg) una hora antes de la inyección de carragenanos. Como

control positivo, se usaron animales tratados con inyecciones subcutáneas de 0,5 mg/kg de dexametasona 4 horas antes de la inyección de carragenanos. Se evaluó la hipernocicepción cada hora durante 8 horas con un filamento de Von Frey de 0,6 g, así como después de 24 y 48 horas después de la inyección de carragenanos.

5 Se muestran los resultados en las figuras 3A y 3B, siendo 3A una gráfica del tiempo frente a la frecuencia de respuesta, y 3B la expresión del área bajo la curva de 3A para cada compuesto sometido a prueba, lo que permite una comparación en porcentaje entre sí.

10 Tal como puede observarse en esas figuras, el tratamiento a corto plazo con eufol redujo significativamente la hipernocicepción mecánica inflamatoria inducida por carragenanos. El eufol condujo a una reducción de la respuesta nociceptiva similar a la del grupo de control tratado con dexametasona.

EJEMPLO 4 – Nocicepción inflamatoria persistente inducida por CFA (adyuvante completo de Freund)

15 Se les inyectó a los animales por vía intraplantar 25 µl de CFA, una dosis que produce hipernocicepción y aumento del tamaño de la pata en la que se realizó la inyección (Neuropharmacology, 41:1006-1012, 2001; Anesth Analg., 101:1763-1769, 2005).

20 Se trataron los animales por vía oral con 30 mg/kg de eufol o 70 mg/kg de gabapentina (control positivo), 1 hora antes de la inyección de CFA. Se midió la hipernocicepción mecánica a través de estimulación con un filamento de Von Frey de 0,6 g en intervalos de tiempo de 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas después de la inyección de CFA, y hasta el restablecimiento de la respuesta nociceptiva. Después de eso, el 3^{er} día, se inició un tratamiento a largo plazo para evaluar el tratamiento prolongado con eufol. Para ello, los animales recibieron 30 mg/kg de eufol al día, por vía oral, durante 5 días, y se evaluó la hipernocicepción una vez al día, 4 horas después de la primera administración. Se evaluó la hipernocicepción mecánica hasta el retorno de la respuesta dolorosa. Después de eso, se inició de nuevo el tratamiento una vez al día, durante 5 días, para evaluar el desarrollo de tolerancia al compuesto, y se evaluó la hipernocicepción hasta el retorno de la respuesta nociceptiva.

30 Se muestran los resultados en las figuras 4A, 4B y 4C, siendo 4A una gráfica del tiempo frente a la frecuencia de respuesta, y 4B y 4C la expresión del área bajo las curvas de 4A para cada compuesto sometido a prueba, lo que permite una comparación en porcentaje entre sí.

35 Tal como puede observarse en las figuras 4A y 4B, el tratamiento agudo con eufol redujo significativamente la hipernocicepción mecánica inducida por CFA, cerca del efecto obtenido con gabapentina.

40 Cuando se administró eufol una vez al día durante 5 días, se observa la inhibición de la respuesta nociceptiva producida por CFA durante los 6 días siguientes de tratamiento. Se redujo la hipernocicepción mecánica de nuevo con el inicio del tratamiento prolongado, tal como se observa con ayuda de las curvas desde el 3^{er} día hasta el 24^o después de la inyección de CFA. Se observó una inhibición similar con el tratamiento prolongado con gabapentina.

EJEMPLO 5 – Dolor neuropático inducido por constricción parcial del nervio ciático

45 El procedimiento empleado en este caso era similar al descrito para ratas (Pain, 43:205-218, 1990), modificado para ratones ((Pain, 76:215-222, 1998), y normalizado por Bortolanza *et al.* (Eur J Pharmacol., 453:203-208, 2002). Se anestesiaron los ratones con hidrato de cloral al 7% (0,6% ml/kg intraplantar). Entonces se expuso el nervio ciático por encima del muslo en torno a la trifurcación ciática, y se ligó 1/3-1/2 de la porción dorsal con un filamento de sutura n.º 8. En el grupo operado en falso, se expuso el nervio ciático sin la ligadura. En el 4^o día posoperatorio, se trató un grupo de animales por vía oral con 30 mg/kg de eufol, y se trató otro grupo por vía oral con 70 mg/kg de gabapentina, como control positivo. Se evaluó el umbral mecánico en tiempos predeterminados después del tratamiento (1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas), a través de estimulación con un filamento de Von Frey de 0,6. Para evaluar el efecto del tratamiento prolongado, se administró a los animales eufol diariamente, desde el 6^o día, durante 5 días y se evaluó la hipernocicepción mecánica una vez al día, 4 h después de la primera administración, hasta el retorno de la respuesta nociceptiva de manera similar al grupo de control. Después de eso, se repitió el protocolo de tratamiento prolongado para evaluar un posible desarrollo de tolerancia al compuesto.

55 Pueden verse los resultados en las figuras 5A, 5B y 5C, siendo 5A una gráfica del tiempo frente a la frecuencia de respuesta, y 5B y 5C la expresión del área bajo las curvas de 4A para cada compuesto sometido a prueba, lo que permite una comparación en porcentaje entre sí.

60 Tal como puede observarse en las figuras 5A y 5B, el tratamiento a corto plazo con eufol o gabapentina inhibió de manera significativa la respuesta nociceptiva mecánica inducida por la constricción parcial del nervio ciático.

65 Del mismo modo, el tratamiento prolongado con eufol o gabapentina, una vez al día, redujo de manera significativa la hipernocicepción mecánica inducida por la constricción parcial del nervio ciático, con retorno a las respuestas nociceptivas en el 10^o día de tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Lanosta-8,24-dien-3-ol para su uso en el tratamiento del dolor.
- 5 2. Lanosta-8,24-dien-3-ol para su uso en el tratamiento del dolor, según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho dolor está asociado con inflamación.
3. Lanosta-8,24-dien-3-ol para su uso en el tratamiento del dolor, según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho dolor está asociado con tumores cancerosos.
- 10 4. Lanosta-8,24-dien-3-ol para su uso en el tratamiento del dolor, según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho lanosta-8,24-dien-3-ol inhibe la respuesta de nocicepción.
- 15 5. Lanosta-8,24-dien-3-ol, para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque se selecciona de uno o más de eufol, tirucalol y lanosterol, sus isómeros, solvatos o hidratos.
- 20 6. Lanosta-8,24-dien-3-ol, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho lanosta-8,24-dien-3-ol se obtiene a partir de plantas de la familia *Euphorbiaceae* o mediante síntesis química.
7. Lanosta-8,24-dien-3-ol, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho lanosta-8,24-dien-3-ol es eufol.

FIG. 1

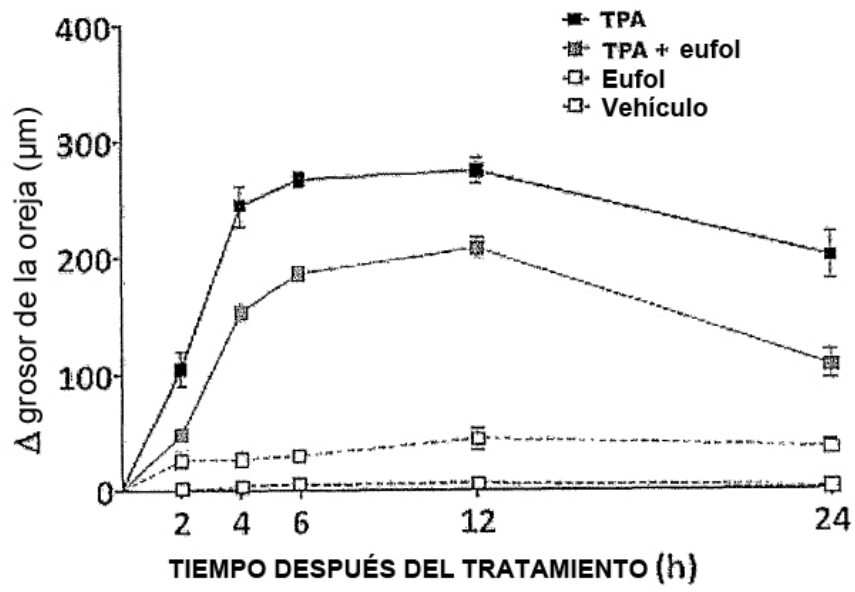


FIG. 2

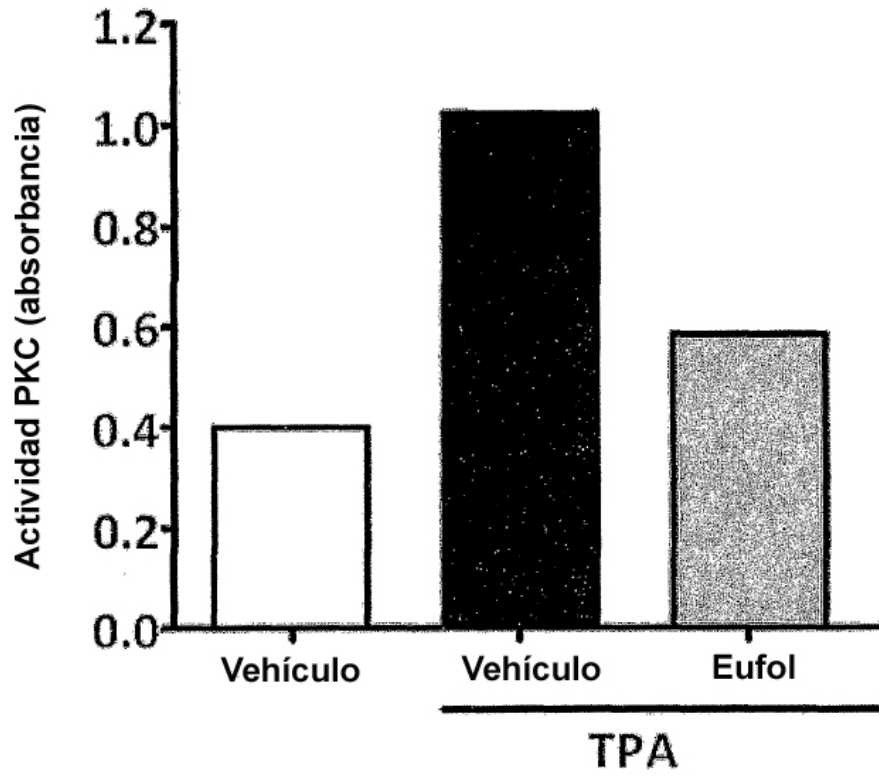


FIG. 3A

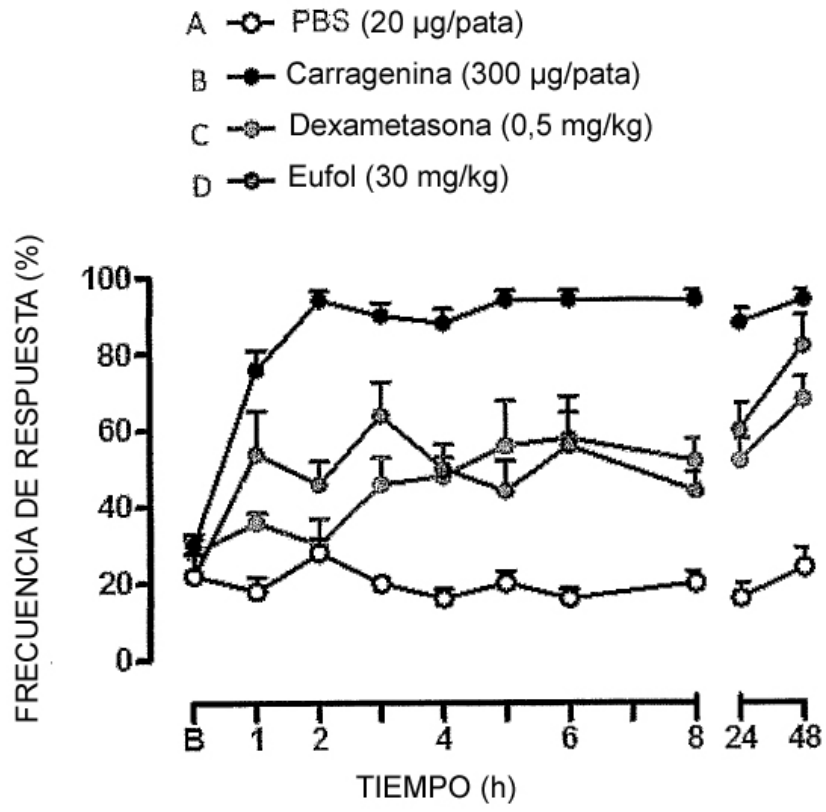


FIG. 3B

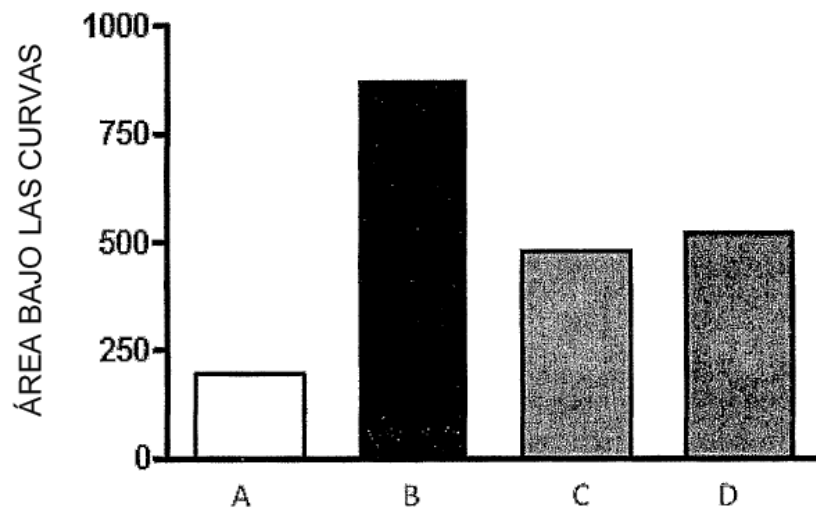


FIG 4A

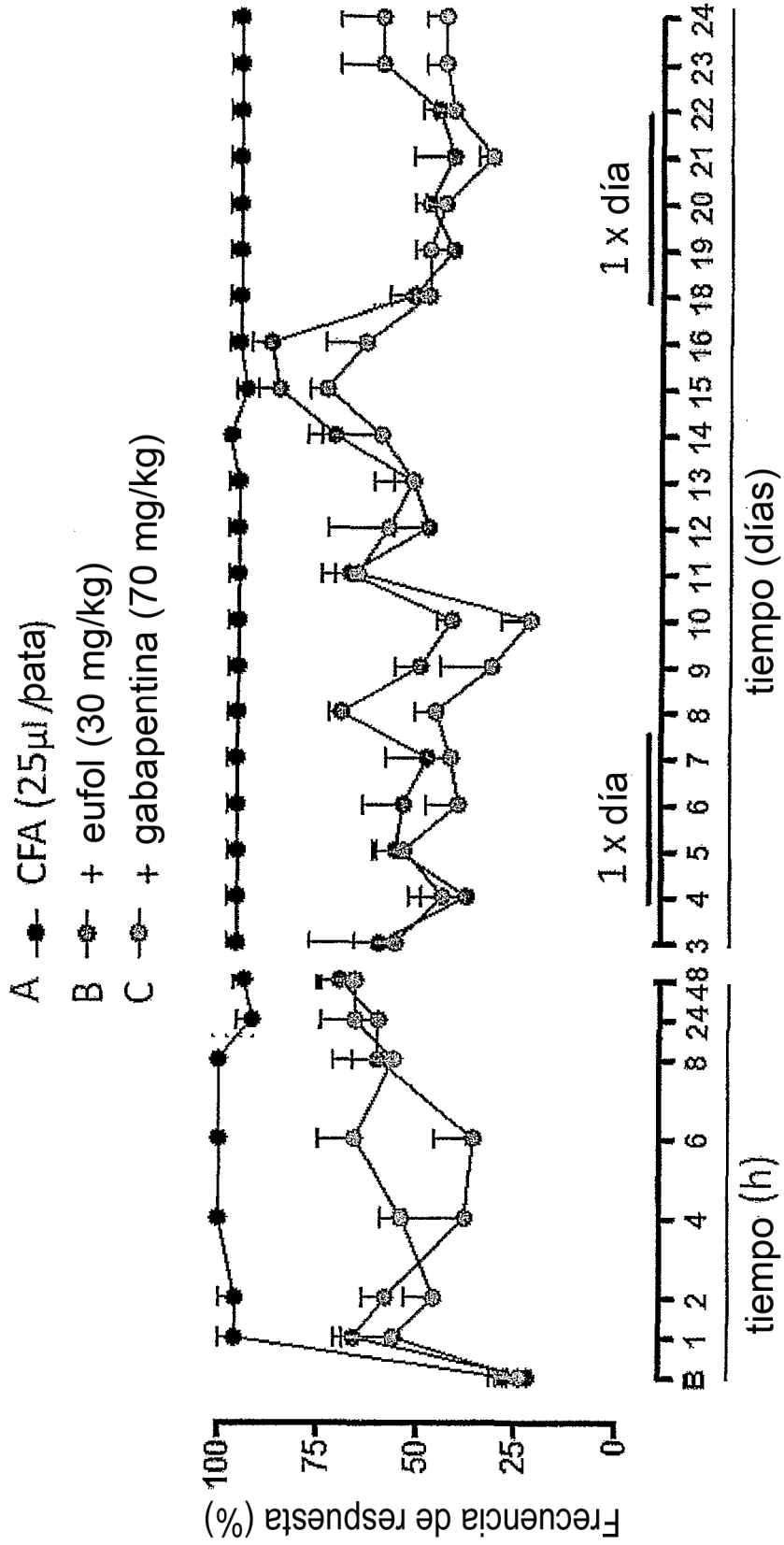


FIG. 4B

FIG. 4C

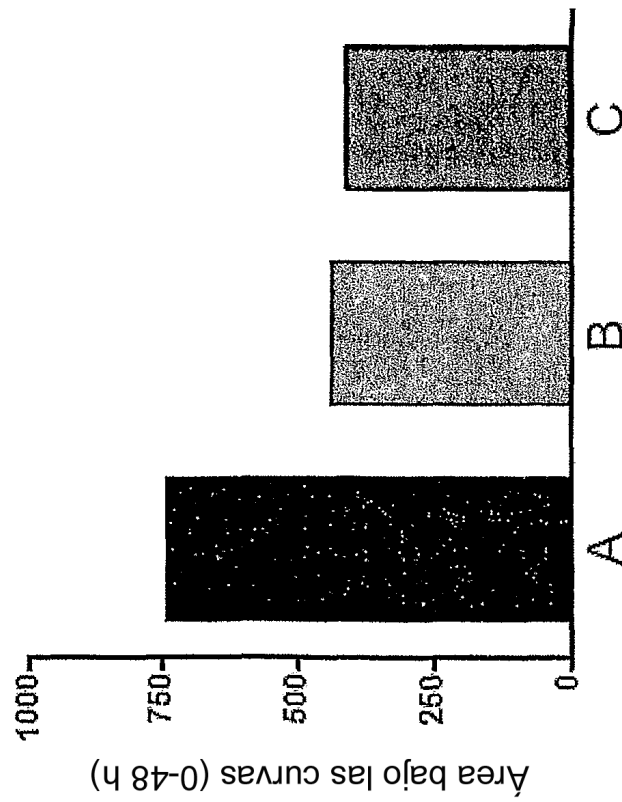
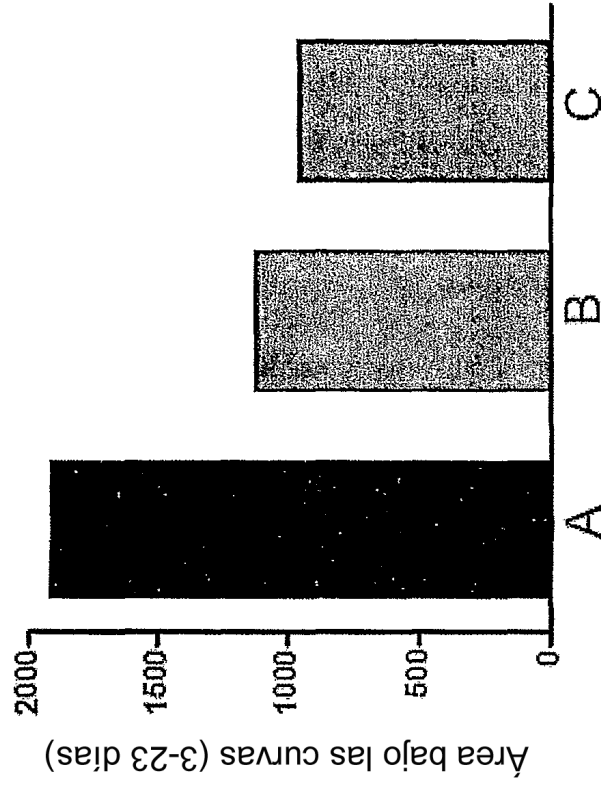


FIG. 5A

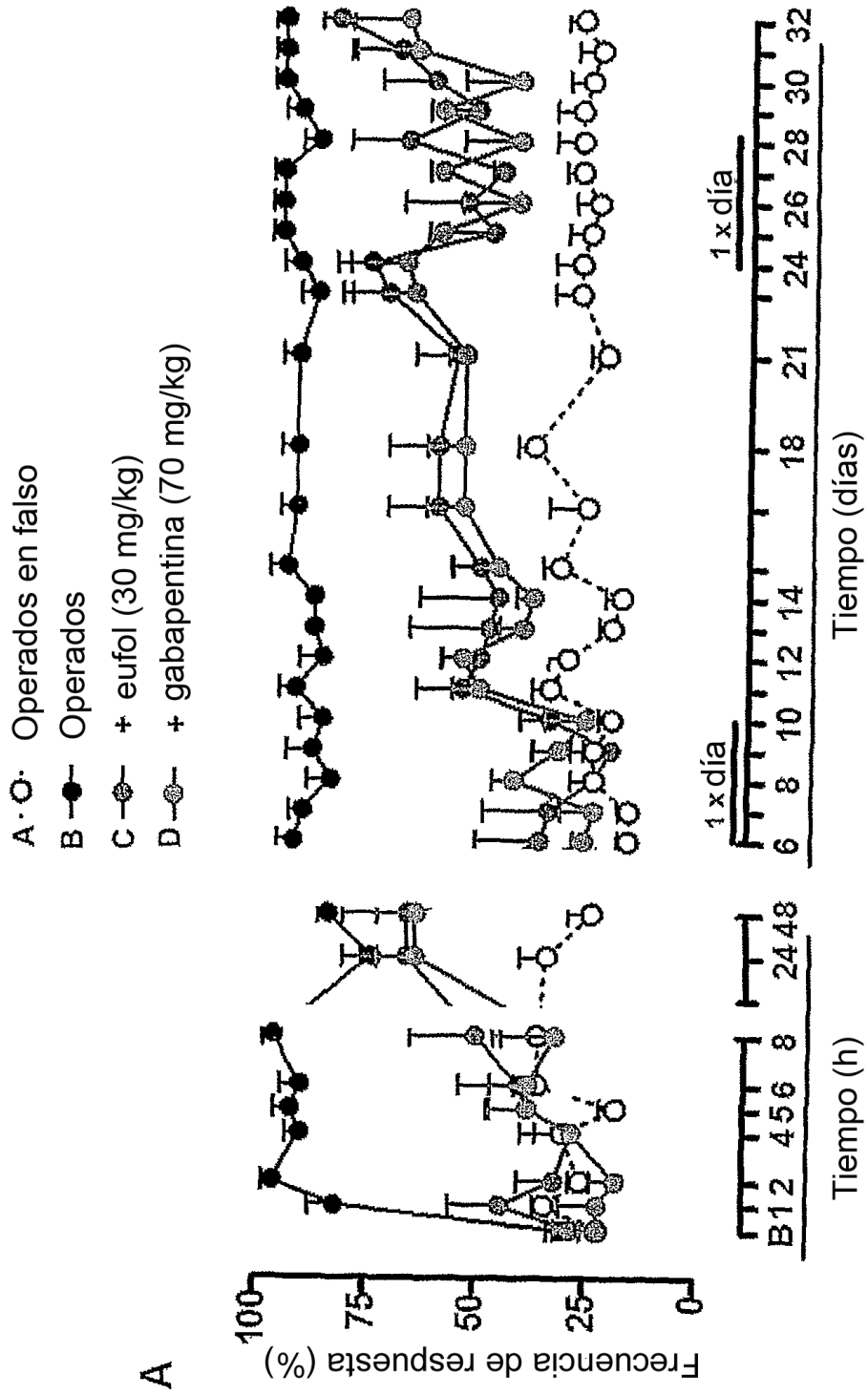


FIG. 5B

FIG. 5C

